

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19)【発行国】 日本国特許庁 (J P)	(19)[ISSUING COUNTRY] Japan Patent Office (JP)
(12)【公報種別】 公開特許公報 (A)	(12)[GAZETTE CATEGORY] Laid-open Kokai Patent (A)
(11)【公開番号】 特開平 1 0 - 1 3 6 9 7 9	(11)[KOKAI NUMBER] Unexamined Japanese Patent (1998-136979) Heisei 10-136979
(43)【公開日】 平成 1 0 年 (1 9 9 8) 5 月 2 6 日	(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION] (1998.5.26)
(54)【発明の名称】 新規酸性 α - アミラーゼ及びそ の製造法	(54)[TITLE of the Invention] Novel acidic (alpha)- amylase and its manufacturing method
(51)【国際特許分類第 6 版】 C12N 9/28 C08B 30/12 C12S 3/02 /(C12N 9/28 C12R 1:07) (C12S 3/02 C12R 1:07)	(51)[IPC Int. Cl. 6] C12N 9/28 C08B 30/12 C12S 3/02 /(C12N 9/28 C12R 1:07) (C12S 3/02 C12R 1:07)
【 F I 】 C12N 9/28 C08B 30/12 C12S 3/02	[FI] C12N 9/28 C08B 30/12 C12S 3/02
【審査請求】 未請求	[REQUEST FOR EXAMINATION] No
【請求項の数】 1 0	[NUMBER OF CLAIMS] 10
【出願形態】 O L	[FORM of APPLICATION] Electronic
【全頁数】 9	[NUMBER OF PAGES] 9

(21)【出願番号】

特願平 8 - 3 0 2 2 4 5

(21)[APPLICATION NUMBER]Japanese Patent Application (1996-302245)
Heisei 8-302245**(22)【出願日】**平成 8 年 (1 9 9 6) 1 1 月 1
3 日**(22)[DATE OF FILING]**

(1996.11.13)

(71)【出願人】**(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]****【識別番号】**

5 9 1 1 1 2 0 3 8

[ID CODE]

591112038

【氏名又は名称】

ナガセ生化学工業株式会社

[NAME OR APPELLATION]

Nagase Seikagaku K.K.

【住所又は居所】大阪府大阪市西区新町 1 丁目 1
番 1 7 号**[ADDRESS or DOMICILE]****(72)【発明者】****(72)[INVENTOR]****【氏名】**

小島 岩夫

[NAME OR APPELLATION]

Iwao Kojima

【住所又は居所】京都府福知山市長田野町 1 - 5
2 ナガセ生化学工業株式会社
福知山工場内**[ADDRESS or DOMICILE]****(72)【発明者】****(72)[INVENTOR]****【氏名】**

鈴木 裕治

[NAME OR APPELLATION]

Yuuji Suzuki

【住所又は居所】京都府福知山市長田野町 1 - 5
2 ナガセ生化学工業株式会社
福知山工場内**[ADDRESS or DOMICILE]****(72)【発明者】****(72)[INVENTOR]**

【氏名】
劉 曉麗

[NAME OR APPELLATION]
Riyuu Giyourei

【住所又は居所】
京都府福知山市長田野町 1 - 5
2 ナガセ生化学工業株式会社
福知山工場内

[ADDRESS or DOMICILE]

(72) 【発明者】

(72) **[INVENTOR]**

【氏名】
足立 朋子

[NAME OR APPELLATION]
Tomoko Adachi

【住所又は居所】
京都府福知山市長田野町 1 - 5
2 ナガセ生化学工業株式会社
福知山工場内

[ADDRESS or DOMICILE]

(74) 【代理人】

(74) **[AGENT]**

【弁理士】

[PATENT ATTORNEY]

【氏名又は名称】
山本 秀策

[NAME OR APPELLATION]
Shusaku Yamamoto

(57) 【要約】

(57) **[ABSTRACT of the Disclosure]**

【課題】
新規酸性 α -アミラーゼを提供し、酸性かつ高温条件下で澱粉を液化することにより、従来の澱粉分解工業における種々の問題点を一挙に解決すること。

[SUBJECT of the Invention]
A novel acidic (alpha)- amylase is provided, various troubles in the conventional amylolysis industry are solved at once by liquefying a starch under by acidic and high temperature conditions.

【解決手段】
以下の性質：
1) 基質特異性：澱粉に作用し、

[PROBLEM to be solved]
The following characteristics：
1) Substrate specificity：acting on a starch, a

主としてマルトペンタオースおよびマルトヘキサオースを生成する；

2) 至適 pH : 約 pH4.0 である；

3) pH 安定性 : 90℃、15 分間の加熱条件下で約 pH4.5～5.0 で安定である；

4) 温度安定性 : pH4.5 において 15 分間保持した場合、80℃まで安定である；

5) 至適温度 : 約 80℃～90℃である；

6) 分子量 : ゲル濾過法で約 55,000～60,000 である；および、

7) 等電点 : 約 4.2 である；
を有する酸性 α -アミラーゼ。

malto pentaose and a malto hexaose are mainly generated.;

2) Optimum pH : it is approximate pH 4.0.;

3) pH stability : it is stable under heating conditions of 90 degrees-Celsius and 15 minutes at an approximate pH 4.5-5.0.;

4) Temperature stability : when it maintains for 15 minutes in pH4.5, it is stable to 80 degrees-Celsius.;

5) Optimum temperature : about 80 degrees-Celsius-90 degrees-Celsius.;

6) Molecular weight : about 55,000 - 60,000 in a gel filtration process.;

And

7) isoelectric point: about 4.2

Acid (alpha)- amylase which has these.

[SDO CLJ]

[CLAIMS]

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の理化学的性質を有する酸性 α -アミラーゼ：

1) 基質特異性 : 澱粉に作用し、主としてマルトペンタオースおよびマルトヘキサオースを生成する；

2) 至適 pH : 約 pH4.0 である；

3) pH 安定性 : 100mM 酢酸緩衝液中で 90℃、15 分間の加熱条件下で約 pH4.5～5.0 で安定である；

4) 温度安定性 : 100mM 酢酸緩衝液中 pH4.5 において 15 分間保持した場合、80℃まで安定である；

5) 至適温度 : 約 80℃～90℃である；

[CLAIM 1]

Acid (alpha)- amylase which has the following physicochemical properties :

1) Substrate specificity : acting on starch, a malto pentaose and a malto hexaose are mainly generated.;

2) Optimum pH : it is an approximate pH 4.0.;

3) pH stability : it is stable under heating conditions inside of 100 mM acetic-acid buffer for 90 degrees-Celsius and 15 minutes at an approximate pH 4.5-5.0.;

4) Temperature stability : when it maintains for 15 minutes in pH4.5 in 100-mM acetic-acid buffer, it is stable to 80 degrees-Celsius.;

5) Optimum temperature : it is about 80 degrees-Celsius-90 degrees-Celsius.;

6) Molecular weight : it is about 55,000 - 60,000 in a gel filtration process.;

And

7) isoelectric point: it is about 4.2.

6) 分子量：ゲル濾過法で約 55,000～60,000 である；および、

7) 等電点：約 4.2 である。

【請求項 2】

さらに、至適温度が 3mM のカルシウムイオンの存在による影響を受けない、請求項 1 に記載の酸性 α -アミラーゼ。

[CLAIM 2]

Furthermore, acid (alpha)- amylase of Claim 1 which does not receive the influence depended in the presence of the calcium ion whose optimum temperature is 3 mM.

【請求項 3】

請求項 1 に記載の酸性 α -アミラーゼを製造する方法であって、バチルス属に属する微生物を培養する工程を包含する、方法。

[CLAIM 3]

It is the method of manufacturing the acid (alpha)- amylase of Claim 1, comprised such that a method to include the process which cultivates the microorganisms belonged to the Bacillus.

【請求項 4】

前記微生物がバチルス アシドカルダリウス (Bacillus acidocaldarius)である請求項 3 記載の製造方法。

[CLAIM 4]

The manufacturing method of Claim 3 whose said microorganisms are Bacillus acidocaldarius (Bacillus acidocaldarius).

【請求項 5】

前記微生物がバチルス アシドカルダリウス (Bacillus acidocaldarius) KSTM-2037 株である請求項 4 記載の製造方法。

[CLAIM 5]

The manufacturing method of Claim 4 in which said microorganisms are a Bacillus acidocaldarius (Bacillus acidocaldarius) KSTM-2037 strain.

【請求項 6】

澱粉を液化する方法であって、請求項 1 または請求項 2 に記載の酸性 α -アミラーゼと澱粉とを反応させる工程を包含する、方法。

[CLAIM 6]

It is a method of liquefying a starch, comprised such that a method including a process to which the acid (alpha)- amylase and the starch of Claim 1 or Claim 2 are made to react.

【請求項 7】

前記酸性 α -アミラーゼがバチルス アシドカルダリウス (Bacillus acidocaldarius)から得

[CLAIM 7]

The method of Claim 6 that said acid (alpha)- amylase is obtained from a Bacillus acidocaldarius (Bacillus acidocaldarius).

られる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記微生物が、バチルス アシ
ドカルダリウス (Bacillus
acidocaldarius) KSTM-2037 株
である、請求項 7 に記載の方法。

[CLAIM 8]

The method of Claim 7 in which said microorganism is a *Bacillus acidocaldarius* (*Bacillus acidocaldarius*) KSTM-2037 strain.

【請求項 9】

前記反応が、85℃以上の温度
で、pH が 4.0 から 5.5 の間で行
われる、請求項 8 に記載の方法。

[CLAIM 9]

The method of Claim 8 in which said reaction is performed between 5.5 from pH4.0 at the temperature more than 85 degrees-Celsius.

【請求項 10】

前記反応が、カルシウムを添加
しない、請求項 8 に記載の方法。

[CLAIM 10]

The method of Claim 8 in which said reaction does not add calcium.

[/SDO]**[/SDO]****[SDO DEJ]****[SDO DEJ]****[DETAILED DESCRIPTION of the INVENTION]****【発明の詳細な説明】****【0001】****[0001]****【発明の属する技術分野】**

本願発明は新規な酸性 α -アミ
ラーゼ及びその製造方法、その
新規な酸性 α -アミラーゼを用
いる澱粉の液化方法に関する。
更に詳しくは、バチルス属に属
する微生物を培養することによ
り得られる酸性 α -アミラーゼ
及びその製造方法、澱粉スラリ
ーの液化方法に関する。

[TECHNICAL FIELD of the Invention]

This invention relates to novel acid (alpha)-amylase and its manufacturing method, and a liquefying method of a starch using this novel acid (alpha)- amylase.

In more detail, it is related with the acid (alpha)-amylase obtained by cultivating the microorganisms belonging to *Bacillus* and its manufacturing method, and the liquefying method of a starch slurry.

【0002】**[0002]****【従来技術】****[PRIOR ART]**

The process which generates oligosaccharides,

澱粉からブドウ糖、マルトースなどのオリゴ糖を生成させる工程は、 α -アミラーゼを用いる澱粉の液化工程とグルコアミラーゼによる糖化工程を含んでいる。トウモロコシ澱粉を原料とする場合には、二段液化法及びジェットクッカー法による液化が常法として用いられている。その方法は、まず、澱粉を pH 6 ~ 6.5、95 ~ 105°C の条件下で Bacillus licheniformis や Bacillus subtilis 等が生産する α -アミラーゼで液化させ、次いで、pH 4.5、60 °C の条件下で Aspergillus niger 等が生産するグルコアミラーゼで糖化させるという工程を含んでいる。

【0003】

これまでに知られている α -アミラーゼのほとんどは至適 pH が 6 付近であるために、澱粉の液化においては水酸化カルシウムなどにより澱粉スラリーの pH を 6 付近まで上昇させた後、液化工程が実施されている。しかしながら、液化工程に次ぐ糖化工程では、現在主に使用されているグルコアミラーゼの至適 pH が 4.5 付近であることから、再度 pH を 4.5 付近に調整し直すという煩雑な工程が必要となっている。また pH 6 以上の液化では、アルカリ異性化により糖化後のグルコース収量の低下があると言われている。

【0004】

更に、現在実用されている α -アミラーゼは α -アミラーゼの失活を抑制する目的でカルシウ

such as glucose and maltose, from a starch contains the liquefying process of the starch which uses (alpha)- amylase, and the saccharified process by the glucoamylase.

When using a corn starch as a raw material, liquefying by the jet cooker method and two-stage-liquefaction method is used as a conventional method.

This method is first liquefied by the (alpha)-amylase to which Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis etc. produce a starch under pH 6-6.5, 95-105 degrees-Celsius conditions.

Subsequently, the process of making it saccharify by the glucoamylase which Aspergillus niger etc. produces at pH 4.5 and 60 degrees-Celsius conditions is included.

[0003]

Since optimum pHs are in the vicinity of 6, the liquefying process is implemented after most of the (alpha)- amylase known until now raises pH of a starch slurry to the vicinity of 6 by a calcium hydroxide etc. in liquefying of a starch. However, in the saccharified process which ranks second to a liquefying process, the complicated process of readjusting pH to the 4.5 neighborhoods again is needed from the optimum pHs of the glucoamylase mainly used now being the 4.5 neighborhoods.

Moreover, in the liquefying more than pH 6, it is said that there is a fall of the glucose yield after saccharified according to alkali isomerization.

[0004]

Furthermore, it is a conventional method that a calcium ion (a calcium hydroxide etc. is about 3 mM for liquefying a starch on 95-105

ムイオン（工業的には 95～105℃の条件下で澱粉の液化を行うには水酸化カルシウム等が 3mM 程度）が添加されるのが常法であるが、次の精製段階でのカルシウムイオンの除去工程も工程煩雑化の一因となっている。

【0005】

上記問題点を解決すべく、pH4 付近の酸性領域で作用しかつ耐熱性を有する各種 α -アミラーゼ分離され、研究されている。現在知られている Bacillus acidocaldarius 由来の酸性 α -アミラーゼを表 1 に示す。

【0006】

【表 1】

【0007】

しかしながら、未だ、高温で酸性条件下で澱粉の液化に使用し得る酵素が得られていないのが現状である。

【0008】

他方で、近年活発に行われている超好熱菌の研究成果として、各種超耐熱性酵素が見いだされている。例えば、超好熱菌由来の超耐熱性中性 α -アミラーゼは、その活性がカルシウムイオンに依存せず、その超耐熱性ゆえに高温酸性条件下でトウモロコシ澱粉の液化に使用できる可能性がある。しかしながら、超好熱菌の酵素発現量は非常に低

degrees-Celsius conditions industrially) is added in order for the (alpha)- amylase used now to suppress a deactivation of (alpha)- amylase.

However, the elimination process of the calcium ion in the following purification phase also serves as a cause of the formation of process complicated.

[0005]

The above-mentioned trouble should be solved, various (alpha)- amylases that act in the acid range near pH4 and have a heat-resisting property are separated, and It is investigated.

The acid (alpha)- amylase derived from Bacillus acidocaldarius known now is shown in Table 1.

[0006]

[TABLE 1]

[0007]

However, the present condition is that the enzyme which can be used for liquefying of a starch on acid conditions by high temperature is not yet obtained.

[0008]

On the other hand, various super-heat-resisting property enzymes are found out as a research result of the hyperthermophilic microbe performed actively in recent years.

For example, the activity may not be dependent on a calcium ion, and may be able to use the super-heat-resisting property neutral (alpha)- amylase of the hyperthermophilic microbe origin for liquefying of a corn starch on the super-heat-resisting property, therefore high temperature acidity conditions.

However, the enzyme expression level of a hyperthermophilic microbe is very low, it uses

く、工業生産には遺伝子組み換え株として用いざるをえず、食品業界での使用は非常に困難である。

for industrial production as a gene-recombination strain, and a colander is not obtained, but use in the foodstuffs industry is very difficult.

【0009】

[0009]

【発明が解決しようとする課題】

従って、遺伝子組換えによらずに大量生産が可能であり、酸性側に至適pH及び安定pH範囲を有しかつ耐熱性である α -アミラーゼが求められている。

[PROBLEM to be solved by the Invention]

Therefore, mass production is possible, without depending gene recombinant, and it has an optimum pH and a stable pH range in an acidity side, and the (alpha)- amylase which is a heat-resisting property is called for.

【0010】

[0010]

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、酸性側に至適pH及び安定pH範囲を有し、かつ耐熱性である α -アミラーゼを生産する菌株を求めるために広く自然界より検索した結果、京都府福知山市の土壤中から採取された Bacillus acidocaldarius KSTM-2037 株が、上記目的を達成するものであることを発見し、本願発明を完成するに至った。Bacillus acidocaldarius 由来の耐熱性かつ耐酸性 α -アミラーゼは既に報告されているが(表1)、本願発明の α -アミラーゼの耐熱性はそれを上回るものであることから、新規酵素である。

[MEANS to solve the Problem]

This inventor have an optimum pH and a stable pH range in an acidity side, and in order to find for the strain which produces the (alpha)-amylase which is a heat-resisting property, it searched from nature widely.

Consequently, -2037 strain of Bacillus acidocaldarius KSTM collected out of the soil of Fukuchiyama-shi, Kyoto prefecture discovers that it is what attains the above-mentioned objective, it came to perfect this invention.

Although the heat-resisting property and the acid-proof (alpha)- amylase derived from Bacillus acidocaldarius are already reported (Table 1), since the heat-resisting property of the (alpha)- amylase of this invention exceeds it, it is a novel enzyme.

【0011】

[0011]

【発明の実施の形態】

本願発明は、以下の1) から7)

[EMBODIMENT of the Invention]

This invention relates to the acid (alpha)-

の理化学的性質を有する酸性 α -アミラーゼに関する。

amylase which has the following physicochemical properties of 1 to 7.

【0012】

- 1) 基質特異性：澱粉に作用し、マルトペンタオースおよびマルトヘキサオースを生成する；
- 2) 至適 pH：約 pH4.0 である；
- 3) pH 安定性：100mM 酢酸緩衝液中で 90℃、15 分間の加熱条件下で約 pH4.5～5.0 で安定である；
- 4) 温度安定性：100mM 酢酸緩衝液中 pH4.5 において 15 分間保持した場合、80℃まで安定である；
- 5) 至適温度：約 80℃～90℃である；
- 6) 分子量：ゲル濾過法で約 55,000～60,000 である；および、
- 7) 等電点：約 4.2 である。

[0012]

- 1) Substrate specificity : acting on a starch, a malto pentaose and a malto hexaose are generated.;
- 2) Optimum pH : it is an approximate pH 4.0.;
- 3) pH stability : in 100-mM acetic-acid buffer, it is stable at an approximate pH 4.5-5.0 under heating conditions of 90 degrees-Celsius and 15 minutes;
- 4) Temperature stability : when it maintains for 15 minutes in pH4.5 in 100-mM acetic-acid buffer, it is stable to 80 degrees-Celsius.;
- 5) Optimum temperature : it is about 80 degrees-Celsius-90 degrees-Celsius.;
- 6) Molecular weight : it is about 55,000 - 60,000 in a gel filtration process.;
- And
- 7) Isoelectric point: it is about 4.2.

【0013】

好適な実施態様においては、至適温度が 3mM のカルシウムイオンの存在による影響を受けない酸性 α -アミラーゼである。

[0013]

In suitable Embodiment, it is acid (alpha)-amylase which does not receive the influence depended in the presence of the calcium ion whose optimum temperature is 3 mM.

【0014】

さらに、本願発明は、上記酸性 α -アミラーゼを製造する方法であって、バチルス属に属する微生物を培養する工程を包含する。

[0014]

Furthermore, this invention is the method of manufacturing the above-mentioned acid (alpha)- amylase, comprised such that the process which cultivates the microorganisms belonged to the Bacillus is included.

【0015】

好適な実施態様においては、前記微生物がバチルス アシドカルダリウス (Bacillus acidocaldarius) である。

[0015]

In suitable Embodiment, said microorganisms are Bacillus acidocaldariuses (Bacillus acidocaldarius).

【 0 0 1 6 】

さらに好適な実施態様においては、前記微生物がバチルス アシドカルダリウス (Bacillus acidocaldarius) KSTM-2037 株である。

【 0 0 1 7 】

また、本願発明は、澱粉を液化する方法であって、上記酸性 α -アミラーゼと澱粉とを反応させる工程を包含する。

【 0 0 1 8 】

好適な実施態様においては、前記酸性 α -アミラーゼがバチルス アシドカルダリウス (Bacillus acidocaldarius)から得られる。

【 0 0 1 9 】

さらに好適な実施態様においては、前記微生物がバチルス アシドカルダリウス (Bacillus acidocaldarius) KSTM-2037 株である。

【 0 0 2 0 】

好適な実施態様においては、前記反応が、85℃以上の温度で行われる。

【 0 0 2 1 】

好適な実施態様においては、前記反応が、pHが4.0から5.5の間で行われる。さらに、好適な実施態様においては、前記反応が、カルシウムを添加しないで行われる。

【 0 0 2 2 】

以下、本願発明を説明する。

[0016]

In a further suitable Embodiment, said microorganisms is a *Bacillus acidocaldarius* (*Bacillus acidocaldarius*) KSTM-2037 strain.

[0017]

Moreover, this invention is the method of liquefying a starch, comprised such that the process to which the above-mentioned acid (α)-amylase and a starch are made to react is included.

[0018]

In suitable Embodiment, said acid (α)-amylase is obtained from a *Bacillus acidocaldarius* (*Bacillus acidocaldarius*).

[0019]

In a further suitable Embodiment, said microorganisms is a *Bacillus acidocaldarius* (*Bacillus acidocaldarius*) KSTM-2037 strain.

[0020]

In suitable Embodiment, said reaction is performed at the temperature more than 85 degrees-Celsius.

[0021]

In a suitable Embodiment, said reaction is performed between 5.5 from pH4.0. Furthermore, in suitable Embodiment, said reaction is performed without adding calcium.

[0022]

Hereafter, this invention is demonstrated.

【0023】

(本アミラーゼを生産する菌株の選択と同定) 本願発明の酸性 α -アミラーゼは、Bacillus 属菌、特に Bacillus acidocaldarius KSTM-2037 株) により生産される。この菌株は、京都府福知山市の土壌中から単離された。単離された微生物は、以下に示すような菌学的性状を示した。菌学的性質の試験及び分類法は「バージェズマニュアル」に従って行った。

【0024】

A. 形態

- (1) 細胞の形 桿菌 (やや湾曲)
 (2) 細胞の大きさ $0.4-0.6 \times 1.5-3.0 \mu m$
 (3) 運動性の有無 +
 (4) 胞子の育無 +
 (5) グラム染色 + (幼若細胞)
 (6) 坑酸性染色 -

B. 各培地における生育状態

- (1) 標準寒天平板培養 (pH5 修正) 薄茶色, 光沢有り, スムーズ,
 不正門(波状)
 (2) 標準寒天斜面培養 (pH5 修正) 薄茶色, 光沢有り, スムーズ
 (3) 標準液体培養 (pH5 修正) 全体的にほぼ均一に混濁
 (4) 標準ゼラチン穿刺培養 (pH5 修正) 殆ど生育せず

[0023]

(The choice and identification of a strain which produce this amylase)

The acid (α)- amylase of this invention is produced by a *Bacillus* genus, especially KSTM-2037 strain of *Bacillus acidocaldarius*.

It isolated this strain out of the soil of Fukuchiyama-shi, Kyoto prefecture.

The microorganisms which was isolated shows the mycological quality as shown below.

An examination and classification of mycological characteristics were performed according to the "Bergey's manual."

[0024]

A. Form

- (1) Form of a cell Bacillus (it curved a little)
 (2) Size of a cell $0.4-0.6 \times 1.5-3.0 \text{ micronm}$
 (3) Motile existence +
 (4) Existence of a spore +
 (5) Gram's stain + (juvenile cell)
 (6) Hole acidity coloring -

B. The growth state in each culture medium

- (1) Standard agar plate culture (pH5 correction) A light-brown color, a gloss existence, smoothness, irregular circle (wavelike)
 (2) standard agar slant culture (pH5 correction) a light-brown color and a gloss existence, smooth
 (3) Standard liquid culture (pH5 correction) It became muddy substantially uniformly entirely.
 (4) Standard gelatin stab culture (pH5 correction) It hardly grows.
 (5) Litmus milk No change

C. Physiological characteristic

(5) リトマスミルク 変化なし	(1)	Reducibility of nitrate
C. 生理学的性質	(2)	Denitrification reaction
(1) 硝酸塩の還元性	(3)	Methyl-Red examination
—	ND	
(2) 脱窒反応	(4)	VP test
—	(5)	Generation of indole
(3) メチルレッド試験	—	
ND	(6)	Generation of a hydrogen sulfide
(4) V P テ ス ト	—	
—	(7)	Hydrolysis of a starch
(5) インドールの生成	+	
—	(8)	Utilization of a citric acid
(6) 硫化水素の生成	ND	
—	(9)	Utilization of the source of inorganic nitrogen
(7) 澱粉の加水分解	Nitrate	+
+	Ammonium salt	+
(8) クエン酸の利用	(10)	Generation of a pigment
ND	—	
(9) 無機窒素源の利用	(11)	Urease activity
硝酸塩	ND	
+	(12)	Oxidase activity
アンモニウム塩	(13)	Catalase activity
+	(14)	The range of growth
(10) 色素の生成	PH	6.0- 5.5+
—	4.5+ 4.0-	
(11) ウレアーゼ活性	Temperature	40
ND	degrees-Celsius-	45 degrees-Celsius+
(12) オキシダーゼ活性	60 degrees-Celsius+	65 degrees-Celsius -
—	(15)	Attitude with respect to oxygen
(13) カタラーゼ活性	Aerotropism	
+	(16)	Generation of dioxy acetone
(14) 生育の範囲	—	
pH	(17)	Degradation of hippuric acid
6.0- 5.5+ 4.5+ 4.0-	ND	
温度	(18)	Degradation of an amino acid
40℃ - 45℃ + 60℃ +	Lysine ND Arginine ND	
65℃ -	Ornithine ND	
(15) 酸素に対する態度	(19)	Deamination of phenylalanine
好気性	ND	
(16) ジオキシアセトンの生成	(20)	Temperature resistance (85
—	degrees-Celsius, 10 minutes)	+
	(21)	Sodium chloride is resistant.
	2.0%+ 5.0% - 7.0% - 10% -	
	(22)	Growth in a sub- row agar medium

(17) 馬尿酸の分解 ND	-	(23) Growth of a 0.001% lysozyme culture medium	-
(18) アミノ酸の分解 リジン ND アルギニン ND	-	(24) Disassembly of a tyrosine	-
オルニチン ND	(25) Citric-acid * ammonium agar medium	Alkali production which comes out	ND
(19) フェニルアラニンの脱アミノ ND	(26) Degradation of casein	-	-
(20) 温度抵抗性 (85°C, 10分) +	(27) Degradation of gelatin	-	-
(21) 塩化ナトリウムの耐性 2.0%+ 5.0%- 7.0%- 10% -	(28) Growth in an anaerobic culture medium	-	-
(22) サブロー寒天培地における生育 -	(29) Growth in a MacConkey's medium	-	-
(23) 0.001% リゾチーム培地の生育 -	(30) Lecithinase reaction	ND	ND
(24) チロシンの分解 -	(31) Alkali production in VP culture medium	ND	ND
(25) クエン酸・アンモニウム寒天培地 でのアルカリ産生 ND	(32) Utilization and the raw acidity of saccharides		
(26) カゼインの分解 -	(a) L- arabinose	-	-
(27) ゼラチンの分解 -	(b) D-xylose	+	+
(28) 嫌気性培地における生育 -	(c) D-glucose	+	+
(29) マッコンキー培地における生育 -	(d) D-mannose	+	+
(30) レシチナーゼ反応 ND	(e) D-fructose	+	+
(31) VP培地におけるアルカリ産生 ND	(f) D-galactose	+	+
(32) 糖類の利用と生酸性	(g) Maltose	+	+
(a) L-アラビノース -	(h) Sucrose	-	-
(b) D-キシロース +	(i) Lactose	-	-
(c) D-グルコース +	(j) Trehalose	+	+
	(k) D-sorbitol	-	-
	(l) D-mannitol	+	+
	(m) Inositol	+	+
	(n) Glycerol	+	+
	(o) Starch	+	+
	(p) Melibiose	-	-
	(q) Salicin	+/	-
	(r) Ethanol	-	-

* It cannot ND : measure.

As mentioned above, this microorganism is named *Bacillus acidocaldarius* (*Bacillus acidocaldarius*) KSTM-2037 strain, entrusted to the institute-of-technology National Institute of Bioscience and Human-Technology, the

- (d) D - マンノース acceptance number is FERM P-15941.
- +
- (e) D - フラクトース
- +
- (f) D - ガラクトース
- +
- (g) 麦 芽 糖
- +
- (h) シ ヨ 糖
-
- (i) 乳 糖
-
- (j) ト レ ハ ロ ー ス
- +
- (k) D - ソルビット
-
- (l) D - マンニット
- +
- (m) イ ノ シ ッ ト
- +
- (n) グ リ セ リ ン
- +
- (o) 澱 粉
- +
- (p) メ リ ビ オ ー ス
-
- (q) サ リ シ ン
- ±
- (r) エ タ ノ ー ル
-

*ND : 測定できず

以上から、この微生物はバチルス
 アシドカルダリウス
 (Bacillus acidocaldarius)
 KSTM-2037 株と命名され、工
 業技術院生命工学工業技術研究
 所に寄託されており、その受託
 番号は FERM P-15941 である。

【 0 0 2 5 】

(培養方法) 本願発明の酸性 α

[0025]

(The culture method)

ーアミラーゼは、例えば、この KSTM-2037 株を培養して得られ得る。培養は、通常通気攪拌培養等により行われ得る。用いる培地には、当業者が通常用いる炭素源、窒素源、その他の必要な無機塩、ミネラルなどを含み得る。

【0026】

炭素源としては、例えば、グルコース、廃糖蜜、転化糖等の他、資化し得る炭水化物、油脂、脂肪酸、アルコール（例えば、メタノール、エタノール）、各種澱粉、澱粉液化液、デキストリン等が、単独でまたは必要に応じて適宜混合して用いられ得る。

【0027】

窒素源としては、例えば、ポリペプトン、酵母エキス、肉エキス、大豆粉、コーンスチープリカー、コーンミル等の有機窒素源の他、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機窒素源が、単独でまたは必要に応じて適宜混合して用いられ得る。

【0028】

無機塩およびミネラルとしては、例えば、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩、コバルト塩、ナトリウム塩、カリウム塩あるいは各種ビタミン類が、単独でまたは必要に応じて適宜混合して、用いられ得る。

【0029】

The acid (alpha)- amylase of this invention -- for example, this KSTM-2037 strain may be cultivated.

A culture may be performed by normal aeration-rotation culture etc.

Those skilled in the art may contain the usually used source of a carbon, the source of nitrogen, other necessary mineral salt, a mineral, etc. in the culture medium to be used.

[0026]

As a source of a carbon, the carbohydrate which can utilize besides a glucose, waste molasses, and invert sugar etc., fats and oils, a fatty acid, alcohol (for example, methanol, ethanol), various starches, a starch liquefying liquid, dextrin, etc. are by itself, or may be used in mixture as appropriate as required, for example.

[0027]

As a source of nitrogen, sources of inorganic nitrogen, such as ammonium sulfate besides sources of organic nitrogen, such as a polypeptone, a yeast extract, a meat extract, soybean meal, a corn steep liquor, and a cone mill, ammonium chloride, ammonium nitrate, and an ammonium phosphate, are by itself, or may be used in mixture as appropriate as required, for example.

[0028]

It may be used as a mineral salt and a mineral, for example, a phosphate, a magnesium salt, a calcium salt, a manganese salt, an iron salt, a zinc salt, a cobalt salt, a sodium salt, a potassium salt, or various vitamins by itself or, when required, an appropriate mixture.

[0029]

培地の pH は通常 pH4.5~5.5、好ましくは pH4.5~5.0 である。培養温度は通常 45~60°C、好ましくは 55~60°C である。培養は、培養温度あるいは培養 pH、通気攪拌の条件等により変動するが、本願発明に用いる微生物の生育及び α -アミラーゼの生産に十分な時間を考慮すると、一般には 18 時間から 3 日間、行われる。

【0030】

(酸性 α -アミラーゼの精製方法) 本願発明の酸性 α -アミラーゼは以下のような方法により精製され得る。まず、培養液を遠心分離または濾過することによって菌体を分離して上清を得る。この上清から通常の精製手段、例えば、塩析法、例えばエタノール、アセトン等を用いる溶媒沈澱法、等電点沈澱法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー法、晶出法などの通常の酵素の精製手段を単独で、あるいは適宜組み合わせることによって精製され得る。得られた酵素は凍結乾燥粉末とし得る。必要に応じて脱塩処理後、凍結乾燥され得る。

【0031】

(力価測定法)

(基質溶液の調製) 基質溶液を次のように調製する：無水物として 1g の精製馬鈴薯澱粉を分散させながら 0.4N-NaOH を 25ml 加え、沸騰水中で 10 分間

PH of a culture medium is usually pH4.5-5.5, preferably it is pH4.5-5.0.

Culture temperature is normal 45-60 degrees-Celsius, preferably it is 55-60 degrees-Celsius.

A culture is fluctuated according to the conditions of culture temperature or Culture pH, and aeration churning etc.

However, if sufficient time for the growth of microorganisms used for this invention and livebirth of (alpha)- amylase is considered, generally it will be carried out for three days from 18 hours.

[0030]

(Purification method of acid (alpha)- amylase)

The acid (alpha)- amylase of this invention may be refined by the following methods.

First, by centrifuging or filtering a culture solution, a microbial cell is separated and a supernatant liquid is obtained.

Purification means normal from this supernatant liquid, for example, it may be refined by combining independently or suitably purification means of normal enzymes, such as the solvent precipitation method using the salting-out method, for example, ethanol, acetone, etc., an isoelectric point precipitation method, an electrophoresis method, an ion-exchange-chromatography method, a gel filtration process, the affinity-chromatography method, and the crystallizing method.

The obtained enzyme can be used as freeze-dried powder.

It may be freeze-dried after the desalting treatment as required.

[0031]

(Potency measuring method)

(Manufacture of a substrate solution)

A substrate solution is prepared as follows :

As an anhydride, while distributing a 1g purification potato starch, 25 ml of 0.4 N-NaOH is added, it heat-dissolves for 10 minutes by boiling in water.



加熱溶解する。この溶解液を冷却し、 $0.4N-CH_3COOH$ を 25ml 加えて、pH を HCl で 4.5 に調整した後、100ml に定容する。これにより、1 (重量)% の馬鈴薯澱粉溶液が得られ、これを基質溶液とする。

This solution is cooled, after adjusting 25 ml, in addition pH to 4.5 by HCl, the fixed containment of the 0.4 N-CH<SB>3</SB>COOH is carried out to 100 ml.

Thereby, the potato starch solution of 1 (weight) percentage is obtained, let this be a substrate solution.

【0032】

(酵素活性の測定) 基質溶液 10ml に酵素液 1 ml を加えて $40^{\circ}C$ で 10 分間反応させ、その反応液 1 ml を取り出し 1/10N HCl 10ml 中に入れ反応を停止する。この反応停止した液を 0.5ml 取り、0.005%ヨード (ヨークカリ 0.05%を含む) 10ml に加え、生ずる青色の $660\mu m$ における吸光度を分光光度計にて測定し、次式によって、酵素活性 (糊精化力) を計算する。

[0032]

(Enzyme active measurement)

1 ml of enzyme liquids is added to 10 ml of substrate solutions, and it is made to react to them for 10 minutes by 40 degrees-Celsius.

1 ml of the reaction mixture is put into removal 1/10N HCl 10 ml, and a reaction is stopped.

0.5 ml of this liquid that carried out the reaction stop is taken, 10 ml of 0.005% iodo (including 0.05% potassium iodide) absorbence in blue 660 micronm(s) produced is measured with a spectrophotometer, enzyme activity (dextrin-ized power) is calculated by following Formula.

【0033】

[0033]

【数1】

[EQUATION 1]

【0034】

上記測定法で、吸光度を $40^{\circ}C$ で、1 分間に 1 %低下させたときの酸性 α -アミラーゼ活性 (糊精化力) を 1 単位と定義する。

[0034]

By the above-mentioned measuring method, the acid (alpha)- amylase active (dextrin-ized power) when 1% reduction of the absorbence is carried out at 40 degrees-Celsius for 1 minute is defined as 1 unit.

【0035】

(酵素的性質の検討) 上記の方法で得られた酸性 α -アミラーゼ (以下、本願発明の酸性 α -アミラーゼという) は、以下の方法でその性質を調べ得る。

[0035]

(Examination of an enzymatic characteristic)

The acid (alpha)- amylase (henceforth the acid (alpha)- amylase of this invention) obtained by the above-mentioned method can investigate the characteristic with the following method.

【0036】

[0036]

1) 基質特異性：本願発明の酸性 α -アミラーゼを、上記1重量%澱粉を含む基質溶液に、80℃、60分間の条件下、作用させる。反応後、反応液を薄層クロマトグラフィーで分析することにより、主としてマルトペンタオースおよびマルトヘキサオースが生成していることを確認し得る。生成物の検出は、シリカゲル 60 薄層プレート（メルク社製）を用い、イソプロピルアルコール：アセトン：水＝40:40:20で室温で展開したときに、マルトペンタオースは0.14、マルトヘキサオースは0.1のRf値を与える。なお、発色は、発色液（アニリン 4ml、ジフェニルアミン 4g、アセトン 200ml、85%リン酸 30mlの混合液）を用いて、105℃、30分加熱して行う。

【0037】

2) 至適 pH：至適 pH は、前記基質溶液の pH を種々変えて、80℃、10分間反応させて測定する。本願発明の酸性 α -アミラーゼの至適 pH は、約 pH4.0 である。

【0038】

3) pH 安定性：各 pH の 100mM 酢酸緩衝液中で 90℃、15分間処理した後、処理液の残存活性を前記力価測定法により、pH4.5、80℃、30分間反応させて測定する。本願の酸性 α -アミラーゼの pH 安定性は、約 pH4.5～5.0 の範囲である。

1) Substrate specificity : making the acid (alpha)- amylase of this invention act on the substrate solution containing said 1 weight% starch the condition for 80 degrees-Celsius and 60 minutes.

It can check after a reaction that the malto pentaose and the malto hexaose are mainly generating by analyzing a reaction mixture with thin layer chromatography.

When a detection of a product is developed at room temperature by isopropyl alcohol:acetone:water =40:40:20 using a silica-gel 60 thin-layer plate (Merck company make), in a malto pentaose, 0.14 and a malto hexaose give the Rf value of 0.1.

In addition, using a color development liquid (liquid mixture of aniline 4 ml, diphenylamine 4g, acetone 200 ml, and 30 ml of 85-% phosphoric acid), 105 degrees-Celsius, a color development is heated for 30 minutes and performed.

[0037]

2) Optimum pH : an optimum pH changes various pHs of said substrate solution, 80 degrees-Celsius, it is made to react for 10 minutes and measured.

The optimum pH of the acid (alpha)- amylase of this invention is an approximate pH 4.0.

[0038]

3) pH stability : after treating in 100-mM acetic-acid buffer of each pH at 90 degrees-Celsius for 15 minutes, it is said potency measuring method about residual activity of a processing solution, it is made to react for 30 minutes at pH4.5, 80 degrees-Celsius, and measured.

pH stability of the acid (alpha)- amylase of this application is the range of an approximate pH 4.5-5.0.

【 0 0 3 9 】

4) 温度安定性 : 100mM 酢酸緩衝液 pH4.5 中で、各温度で 15 分間処理した後、処理液の残存活性を前記力価測定法により、pH4.5、80℃、30 分間反応させて測定する。本願発明の酸性 α -アミラーゼは、80℃で 15 分処理後も 100%の残存活性を有している。

【 0 0 4 0 】

5) 至適温度 : 前記力価測定法により種々の温度で 10 分間反応させて測定する。本願の酸性 α -アミラーゼは、80~90℃に最適温度を有する。

【 0 0 4 1 】

6) 分子量 : カラムとして、Sephadex-100 を用い、10mM NaCl を含む 50mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) 中でゲル濾過して測定する。本願発明の酸性 α -アミラーゼの分子量は約 55,000 から約 60, 000 である。

【 0 0 4 2 】

7) 等電点 : 等電点電気泳動法を用いて測定し得る。本願の酸性 α -アミラーゼの等電点は 4.2 である。

【 0 0 4 3 】

さらに、本願発明の酸性 α -アミラーゼの至適温度、至適 pH、温度安定性、および pH 安定性は、カルシウムイオンの存在により影響されない。

【 0 0 4 4 】

本願発明の酸性 α -アミラーゼ

[0039]

4) Temperature stability : after treating for 15 minutes at each temperature in 100-mM acetic-acid buffer pH4.5, it is said potency measuring method about residual activity of a processing solution, pH4.5, 80 degrees-Celsius, it is made to react for 30 minutes and measured.

As for the acid (alpha)- amylase of this invention, after 15-minute treatment has 100% of residual activity by 80 degrees-Celsius.

[0040]

5) Optimum temperature : making it react for 10 minutes at various temperature with said potency measuring method, and measuring.

The acid (alpha)- amylase of this application has an optimal temperature in 80-90 degrees-Celsius.

[0041]

6) Molecular weight : using Sephadex-100 as a column, in 50-mM acetic-acid buffer (pH5.0) containing 10 mM NaCl, carrying out a gel filtration and measuring.

The molecular weight of the acid (alpha)-amylase of this invention is about 55,000 to about 60 and 000.

[0042]

7) Isoelectric point: it can measure using an isoelectric focusing.

The isoelectric point of the acid (alpha)-amylase of this application is 4.2.

[0043]

Furthermore, the optimum temperature, the optimum pH, the temperature stability, and pH stability of acid (alpha)- amylase of this invention are not influenced in the presence of a calcium ion.

[0044]

If the acid (alpha)- amylase of this invention is

が精製されると、その（部分）アミノ酸配列を基に、この酸性 α -アミラーゼ遺伝子を取得できる。このようにして得られた遺伝子配列（アミノ酸配列）を一部改変して、当業者は周知の方法を用いて、容易に本願発明と同等の酸性 α -アミラーゼを取得し得る。例えば、部位特異的突然変異、M13 ファージを用いる欠失突然変異などの方法で遺伝子配列を改変して、変異型の酸性 α -アミラーゼを取得し得る。また、当業者に周知の変異方法を用いても、変異型の酸性 α -アミラーゼを取得し得る。従って、これらの変異型の酸性 α -アミラーゼであって、実質的に本願発明の酵素と同等の性質を有する酵素も本願発明の範囲内にある。

【0045】

以下、実施例により本願発明の内容を更に具体的に説明するが、本願発明の範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【0046】

【実施例】

（実施例1）

（微生物の培養と酵素の精製）

1) シード培養

可溶性澱粉 1 %、ポリペプトン 0.25 %、酵母エキス 0.25 %、NaCl 0.25 %、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 %、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001 %、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 %、 KH_2PO_4 0.2 %、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 % からの

refined, this acid (alpha)- amylase gene is acquirable based on that (part) amino acid sequence.

Thus, the one part modification of the obtained gene sequence (amino acid sequence) is carried out, those skilled in the art can acquire acid (alpha)- amylase equivalent to this invention easily using the well-known method.

For example, a gene sequence is changed by methods, such as a site specific mutation and the deletion mutation using M13 phage, the acid (alpha)- amylase of a variant can be acquired.

Moreover, even if it uses the well-known variation method for those skilled in the art, the acid (alpha)- amylase of a variant can be acquired.

Therefore, it is acid (alpha)- amylase of these variants, comprised such that the enzyme which has a characteristic substantially equivalent to the enzyme of this invention is also within the limits of this invention.

[0045]

Hereafter, an Example demonstrates the content of this invention still more concretely. However, the range of this invention is not limited to these Examples.

[0046]

[EXAMPLES]

(Example 1)

(A culture of microorganisms and purification of an enzyme)

1) Seed culture

1 % of soluble starches, polypeptone 0.25 %, yeast extract 0.25 %, NaCl 0.25 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 %, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001 %, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 %, 500 ml (pH4.5) of culture mediums which are made of KH_2PO_4 0.2 %



る培地 (pH4.5) 500ml を 3L 容三角フラスコに入れ、121℃で 20 分殺菌後、Bacillus acidocaldarius KSTM-2037 を接種し、60℃、160rpm で 2 日間培養し、シードを得た。

【0047】

2) 培養

1) と同じ組成の培地 300L を 500L 容培養タンクに入れ、121℃で 20 分殺菌後、上記シードを 0.67% (2L) 移植し、60℃、160rpm で 3 日間培養した。その結果、培養液 1ml あたり 4.9 単位の α -アミラーゼが生産された。

【0048】

3) 酵素の精製

α -アミラーゼを含む上記培養液を遠心分離 (7,000rpm、30 分) して、上清を得た。この上清をさらに限外濾過により濃縮後、凍結乾燥したものを粗酵素サンプルとした。粗酵素サンプルを蒸留水に溶解し、硫酸アンモニウムを 40% 飽和になるように加え 5℃で一夜沈澱を生成させた。生成した沈澱を遠心分離により回収後、デリカスター H-100 (三和澱粉工業(株) 製) に吸着させた。吸着酵素を温蒸留水で溶出後、凍結乾燥し、酵素標品とした。

【0049】

(実施例 2)

(酵素的性質の検討)

1) 最適反応温度

and <SB>2</SB>(NH<SB>4</SB>SO<SB>4</SB> 0.2% is put into the 3-L Erlenmeyer flask, bacillus acidocaldarius KSTM-2037 is vaccinated after 20-minute pasteurization by 121 degrees-Celsius, it cultivates for two days by 60 degrees-Celsius and 160 rpm, the seed was obtained.

[0047]

2) Culture

Culture medium 300L of the same composition as 1) is put into the 500-L culture tank, transport of the above-mentioned seed is carried out 0.67% (2L) after 20-minute pasteurization by 121 degrees-Celsius, it cultivated for three days by 60 degrees-Celsius and 160 rpm.

Consequently, 4.9 unit (alpha)- amylase per 1 ml of culture solutions was produced.

[0048]

3) Purification of an enzyme

The above-mentioned culture solution containing (alpha)- amylase is centrifuged (7,000 rpm, 30 minutes), the supernatant liquid was obtained.

What further freeze-dried this supernatant liquid after concentration with the ultrafiltration was made into crude-enzyme a sample.

A crude-enzyme sample is dissolved in distilled water, in addition, overnight precipitation was generated by 5 degrees-Celsius so that it might become saturated 40% about ammonium sulfate.

"Delicaster" - H-100 (product made from Sanwa Starch Industry) was made to adsorb the generated precipitation after a recovery by centrifugation.

An adsorption enzyme is freeze-dried after an elution by warm distilled water, it considered as the enzyme preparation.

[0049]

(Example 2)

(Examination of an enzymatic characteristic)

1) The optimal reaction temperature

The acid (alpha)- amylase (5 unit) of this

実施例 1 で得られた本願発明の酸性 α -アミラーゼ (5 単位) を 1 % 可溶性澱粉 (pH4.5) と 10 分間反応させ、本願発明の酸性 α -アミラーゼの活性の温度依存性及びカルシウムイオン添加による酵素活性への影響を調べた。結果を表 2 に示した。

invention obtained in Example 1 is made to react for 10 minutes with a soluble starch (pH4.5) 1%.

The influence on the active temperature dependency of the acid (alpha)- amylase of this invention and the enzyme activity by calcium ion addition was investigated.

The result was shown to Table 2.

【 0 0 5 0 】

[0050]

【表 2】

[TABLE 2]

【 0 0 5 1 】

表 2 より明らかなように、本願発明の酸性 α -アミラーゼは 80~90℃ に至適温度を持ち、その至適温度はカルシウムイオンの有無に依存しなかった。

[0051]

Obviously from Table 2, the acid (alpha)-amylase of this invention had optimum temperature in 80-90 degrees-Celsius, and it did not depend for the optimum temperature on the existence of a calcium ion.

【 0 0 5 2 】

2) 至適 pH

実施例 1 で得られた本願発明の酸性 α -アミラーゼ (5 単位) を、1 % 可溶性澱粉と 80℃ で 10 分間反応させ、本願発明の酸性 α -アミラーゼの活性の至適 pH、およびカルシウムイオン添加による酵素活性への影響を調べた。結果を表 3 に示した。

[0052]

2) Optimum pH

The acid (alpha)- amylase (5 unit) of this invention obtained in Example 1 is made to react for 10 minutes by the soluble starch and 80 degrees-Celsius 1%.

The influence on the active optimum pH of the acid (alpha)- amylase of this invention and the enzyme activity by calcium ion addition was investigated.

The result was shown to Table 3.

【 0 0 5 3 】

[0053]

【表 3】

[TABLE 3]

【 0 0 5 4 】

表 3 より明らかなように、本願発明の酸性 α -アミラーゼは pH4.0 に至適 pH を持ち、その

[0054]

Obviously from Table 3, the acid (alpha)-amylase of this invention had an optimum pH in pH4.0, and the optimum pH was not dependent on the existence of a calcium ion.

至適 pH はカルシウムイオンの有無に依存しなかった。

【 0 0 5 5 】

3) 温度安定性

実施例 1 で得られた本願発明の酸性 α -アミラーゼ (10 単位) を、数種の温度で 15 分間処理後、残存活性を測定し、本願発明の酸性 α -アミラーゼの温度安定性及び、カルシウムイオン添加による酵素活性への影響を調べた。結果を表 4 に示した。

[0055]

3) Temperature stability

Residual activity is measured for the acid (alpha)- amylase (10 unit) of this invention obtained in Example 1 after treatment for 15 minutes at several sorts of temperature, the influence on the temperature stability of the acid (alpha)- amylase of this invention and the enzyme activity by calcium ion addition was investigated.

The result was shown to Table 4.

【 0 0 5 6 】**[0056]****【表 4】****[TABLE 4]****【 0 0 5 7 】**

表 4 より明らかなように、本願発明の酸性 α -アミラーゼは 80°C まで安定であり、その温度安定性はカルシウムイオンの有無に依存しなかった。

[0057]

Obviously from Table 4, the acid (alpha)- amylase of this invention is stable to 80 degrees-Celsius.

The temperature stability was not dependent on the existence of a calcium ion.

【 0 0 5 8 】

4) pH 安定性

実施例 1 で得られた本願発明の酸性 α -アミラーゼ (10 単位) を、数種の pH で 15 分間処理後、残存活性を測定し、本願発明の酸性 α -アミラーゼの pH 安定性、及びカルシウムイオン添加による酵素活性への影響を調べた。結果を表 5 に示した。

[0058]

4) pH stability

Residual activity is measured for the acid (alpha)- amylase (10 unit) of this invention obtained in Example 1 after treatment for 15 minutes by several sorts of pH, the influence on pH stability of the acid (alpha)- amylase of this invention and the enzyme activity by calcium ion addition was investigated.

The result was shown to Table 5.

【 0 0 5 9 】**[0059]****【表 5】****[TABLE 5]**

【0060】

表5より明らかなように、本願発明の酸性 α -アミラーゼは pH4.5~5.0 まで安定であり、その pH 安定性はカルシウムイオンの有無に依存しなかった。

[0060]

Obviously from Table 5, the acid (α)-amylase of this invention is stable to pH4.5-5.0. It did not depend for the pH stability on the existence of a calcium ion.

【0061】

(実施例3)

(澱粉の液化) 約 40(W/V)% のコーンスターチスラリーに 15u/gDS (DS:基質乾物) の酸性 α -アミラーゼを添加し、スラリーの pH を HCl/NaOH にて 4.5 に調整した後、予め 90°C 程度に保持した水中に徐々に添加した。添加終了後、90°C でさらに 10 分間保持した後、温度を 130°C に上昇させた。上昇後、同温度で 10 分間保持した。約 90°C に冷却後、再度 α -アミラーゼ 10u/gDS を添加し、90°C でさらに 60 分間保持した。対照として現在工業的に使用されている市販の α -アミラーゼ剤「スピターゼ HS」(ナガセ生化学工業(株)製)を pH6 で用いてテストを行った。その結果を表6に示した。なお、スピターゼ HS の場合は、スラリーの pH 調整を Ca(OH)_2 で行った。

[0061]

(Example 3)

(Liquefying of a starch)

The acid (α)- amylase of 15 u/gDS (DS: substrate dry provisions) is added to the cornstarch slurry of about 40 (W/V) percentage, after adjusting pH of a slurry to 4.5 in HCl/NaOH, it maintained to 90 degrees-Celsius grade beforehand and it added gradually to water.

After the addition completion, after further maintaining for 10 minutes by 90 degrees-Celsius, temperature was raised to 130 degrees-Celsius.

It maintained for 10 minutes at the same temperature after the raise.

After cooling to about 90 degrees-Celsius, it is (α)- amylase again. 10 u/gDS is added, it further maintained for 60 minutes by 90 degrees-Celsius.

It tested by using at pH6 the commercial (α)- amylase agent "Spitase HS" (product made from a Nagase Seikagaku Corporation) used industrially as a control now.

The result was shown to Table 6.

In addition, in the case of Spitase HS, pH of a slurry was adjusted by. [Ca(OH)_2]

【0062】**[0062]****【表6】****[TABLE 6]****【0063】**

本願発明の酸性 α -アミラーゼは、従来使用されている中性 α -

[0063]

Even if it compares the acid (α)- amylase of this invention with the neutral (α)- amylase currently used conventionally, it finds that it is

アミラーゼと比べても、遜色が equal.
ないことがわかる。

【0064】

(実施例4)

(液化した澱粉の糖化) 実施例3で得られた澱粉液化液に、本願発明の酸性 α -アミラーゼを用いる場合には pH を調整することなく、市販の糖化酵素剤「アミラックスプラス」(ナガセ生化学工業(株)製) 4u/gDS を添加し、60℃にて 48 時間糖化反応を行った。スピターゼを用いた場合には、pH を 4.5 に調整して、同様に行った。その結果を表7に示した。

[0064]

(Example 4)

(The liquefied starch is saccharified)

Commercial saccharogenic amylase agent "Amylax plus" (product made from Nagase Seikagaku Corporation) 4 u/gDS is added without adjusting pH, in using the acid (α)-amylase of this invention for the starch liquefying liquid obtained in Example 3, the saccharified reaction was performed in 60 degrees-Celsius for 48 hours.

When spitase is used, pH is adjusted to 4.5, it carried out similarly.

The result was shown to Table 7.

【0065】**[0065]****【表7】****[TABLE 7]****【0066】**

本願発明の酸性 α -アミラーゼを用いた場合には、濾過性およびG1収率において従来使用されている中性 α -アミラーゼに比べて良好な結果が得られた。

[0066]

When the acid (α)- amylase of this invention was used, the favorable result was obtained compared with the neutral (α)-amylase currently conventionally used in filterability and G1 yield.

【0067】**[0067]****【発明の効果】**

本願発明の新規酸性 α -アミラーゼは、高温かつ酸性条件下で澱粉の液化に使用され得る。酸性条件下で反応を行うことにより、アルカリ異性化による糖化後のグルコース収量の低下が避けられる。また、活性にカルシウムイオンを必要としないの

[ADVANTAGE of the Invention]

The novel acidity (α)- amylase of this invention may be used for liquefying of a starch on high temperature and acid conditions.

By reacting on acid conditions, the fall of the glucose yield after saccharified being based on alkali isomerization is avoided.

Moreover, since a calcium ion was not actively made necessary and the addition of calcium made necessary became unnecessary, when

で、従来の酵素を用いる場合に必要とされたカルシウムの添加が不要となるため、負荷の大きいカルシウムイオンの除去工程が省略できるとともに、グルコアミラーゼを用いる糖化工程で、再度 pH を調製する必要がなく、グルコース製造工程における著しい改善が可能となった。

using the conventional enzyme, while being able to skip the elimination process of a calcium ion with a large load, in the saccharified process using a glucoamylase, pH did not need to be prepared again and the remarkable improvement in a glucose manufacturing process was completed.

【/SDO】

【/SDO】

DERWENT TERMS AND CONDITIONS

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)